

MECANISME MOLECULAR DE L'ACTIVACIÓ I DE LA PROLIFERACIÓ DELS MACRÒFAGS

ANTONIO CELADA

*Departament de Bioquímica i Fisiologia (Immunologia). Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona*

RESUM

Els macròfags ocupen un lloc clau tant en l'arc eferent com en l'aferent de la resposta immunitària. Per tal de desenvolupar les seves funcions, els macròfags o bé proliferen (augmenta el seu nombre) o bé s'activen (desenvolupen llur capacitat funcional). Ambdós fenòmens són contraposats i induïts per diferents citoquines. Així, per a la proliferació es requereix sobretot M-CSF i per a l'activació, interferó gamma (IFN γ). Aquest últim inhibeix la proliferació.

En un primer grup d'estudis es descriu la interacció de l'interferó γ amb el receptor en la superfície cel·lular dels macròfags. Aquest receptor s'internalitza i es reexpressa a un ritme constant. La internalització és necessària per a la inducció de l'activitat funcional. L'IFN γ utilitza diferents vies metabòliques per induir l'expressió de gens diferents. Centrant-nos en l'expressió del gen de classe II del complex major d'histocompatibilitat, I-A β , hem caracteritzat tres àrees en el promotor que són elements *cis*. A més, hem clonat tres proteïnes que interactuen amb aquestes àrees (factors de transcripció) i que controlen l'expressió del gen. Finalment, respecte a la proliferació, hem trobat un factor de transcripció, PU.1, que estimula la proliferació dels macròfags.

Aquests estudis són els primers per tal de descriure la via que utilitza l'IFN γ des de la membrana cel·lular fins al DNA en el nucli per a induir l'expressió de gens.

MOTS CLAU: *proliferació, activació, interferó gamma, factors de transcripció.*

SUMMARY

Macrophages play a key role, both in the afferent as well as the efferent limbs of the immune response. In

order to develop their functions activated (they become ready to develop a functional activity). Both proliferation and activation are opposed phenomena and they are induced by different sets of cytokines. While M-CSF is required for proliferation, for activation interferon gamma (IFN γ) is the cytokine of choice. Moreover, IFN γ inhibit proliferation.

In a first set of studies we described the interaction of IFN γ with the receptor in the cell surface of macrophages. This receptor is internalized and re-expressed at a constant rate. Internalization seems to be necessary for the induction of functional activity. IFN γ use different pathways to induce the expression of different genes. We studied in particular the expression of the IAB gene that codes for a molecule of class II genes of the major histocompatibility complex. We characterized three areas in the promoter that are cis elements. We also cloned three proteins that interact with these areas and control the gene expression. Finally, concerning the macrophage proliferation we found a transcription factor, PU.1, that is involved in proliferation.

These studies are the first to describe the metabolic pathway used by IFN γ to induce gene expression from the cellular membrane to the DNA in the nuclei.

KEY WORDS: *activation, proliferation, interferon gamma, transcription factors.*

INTRODUCCIÓ

Els macròfags són cèl·lules que deriven de la cèl·lula mare *stem cell* de la medul·la òssia i, en el seu pas per la sang es localitzen en tots els teixits. En la medul·la òssia, les cèl·lules precursors, s'anomenen *monoblasts* i *promonòcits*; durant el seu períple sanguini se'ls anomena *monòcits* i quan es localitzen en els teixits, macròfags. Segons la localització dels diferents teixits, els *macròfags* adopten característiques específiques que els duen a desenvolupar funcions específiques. Així, en el teixit ossi es converteixen en osteoclasts; en el sistema nerviós central, en cèl·lules de micròglia; en la dermis, en cèl·lules de Langerhans; en el sinòvi, en cèl·lules de tipus A; en el teixit connectiu, en histiòcits; en el fetge, en cèl·lules de Kupffer, etc. (Celada, 1993) (vegeu la fig. 1).

Al creixement dels macròfags, com al d'altres cèl·lules hematopoètiques, li cal la presència de factors estimulants (CSF) (vegeu la fig. 2). En el moment actual no sabem quins factors indueixen la cèl·lula mare pluripotent a convertir-se en un tipus cel·lular o un altre. Els macròfags i neutròfils deriven d'una cèl·lula progenitora comuna anomenada *unitat formadora de colònies granulòcit-monòcit* (CFU-GM). Els macròfags,

després d'ésser estimulats per l'endotoxina o la fagocitosi, produeixen dos tipus de factors de creixement: macròfag-CSF (M-CSF) i granulòcit-macròfag (GM-CSF). L'M-CSF, també anomenat CSF-1, és un homodímer de 70 a 90 kD, el receptor del qual és el producte del protooncogen *c-fms*. El receptor de l'M-CSF només es troba present en fagòcits mononuclears i té una activitat proteïna cinasa. El GM-CSF és una glicoproteïna de 22 kD que actua sobre neutròfils, monòcits i eosinòfils. A més a més, els macròfags produeixen interleucina 3 (IL 3), que també indueix proliferació, i altres interleucines com la IL 1 o el factor tumoral de la necrosi, TNF (de l'anglès, *tumor necrosis factor*), que indueixen l'alliberament de M-CSF i de GM-CSF de les cèl·lules endotelials i mesenquimals. D'altra banda, el GM-CSF pot induir la producció de TNF en els macròfags.

El nivell basal de la monocitopoesi és determinat pel balanç d'autoregulació entre els factors de creixement (IL 3, M-CSF i GM-CSF) i inhibidors com la prostaglandina E_2 i la lactoferrina. Com a resposta a un increment de la demanda, els macròfags segreguen M-CSF i GM-CSF en la sang circulant, i amb això estimulen la monocitopoesi en la medul·la òssia. A més, en els focus d'inflamació, després de la fagocitosi, els macròfags segreguen M-CSF i GM-CSF, i així contribueixen a la proliferació

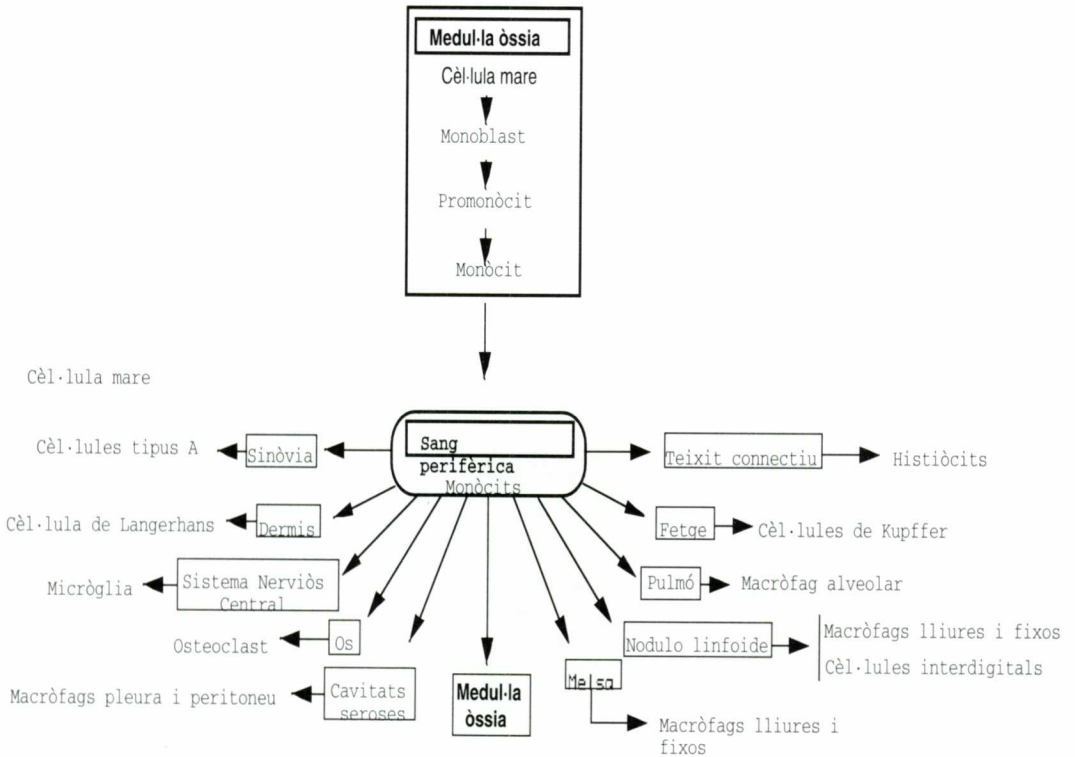


FIGURA 1. Origen i distribució dels macròfags en els diferents teixits.

local de macròfags. Recentment, hem pogut demostrar que en macròfags adults la secreció autocrina del factor B de creixement transformant, TGF β *transforming growth factor β* pot estimular la proliferació de macròfags (Celeda i Maki, 1992). D'altra banda, els limfòcits T activats després de la interacció amb antígens poden estimular la proliferació local de

macròfags mitjançant l'alliberament de M-CSF i GM-CSF, i origina en alguns casos els granulomes.

S'ha vist recentment que el GM-CSF té un efecte diferent segons el tipus cel·lular sobre el qual actua. Sobre els macròfags diferenciats, estimula la proliferació, mentre que sobre les colònies mixtes granulòcit-monòcit fa que es

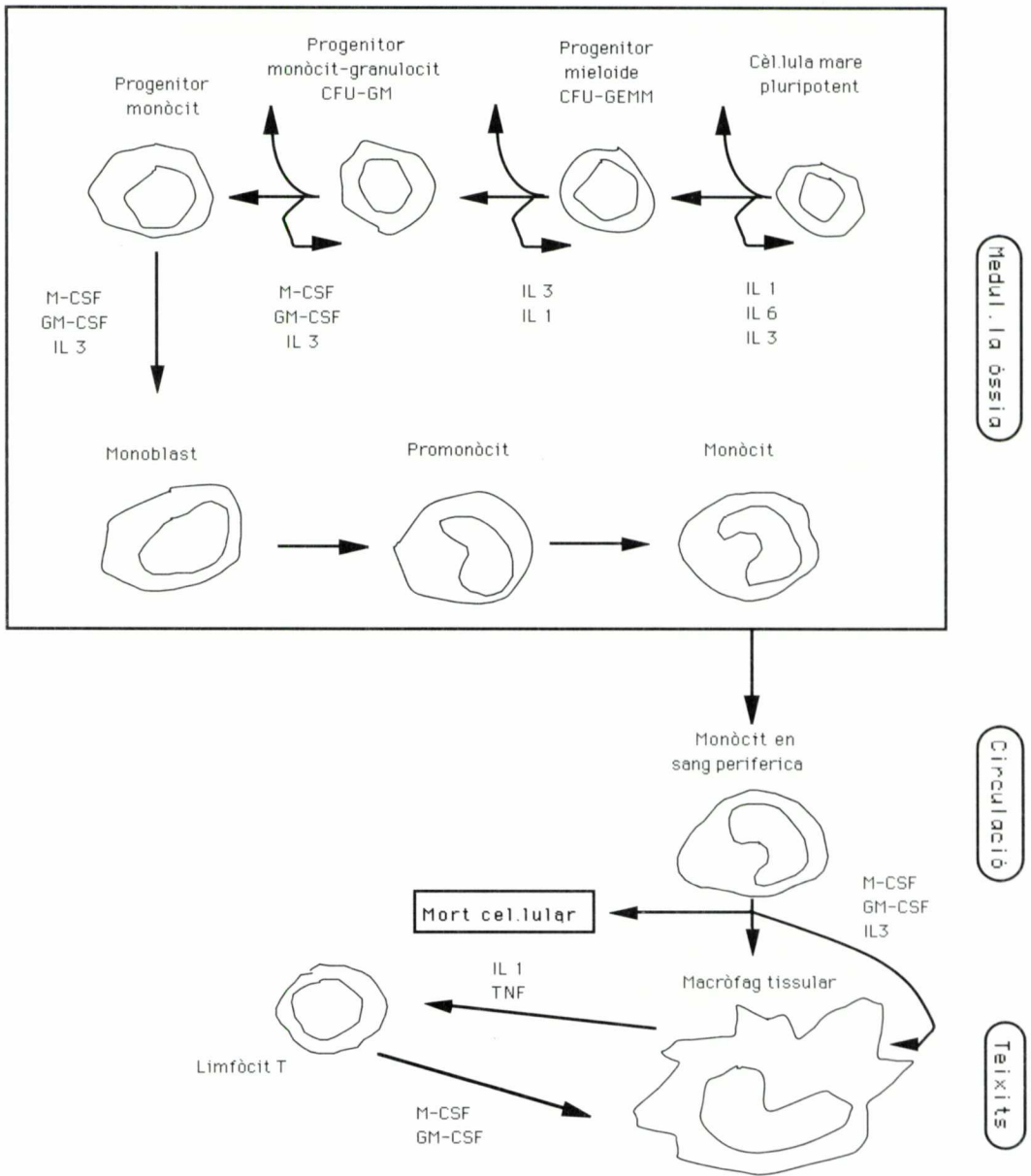


FIGURA 2. Proliferació de macròfags.

diferenciïn en granulòcits. En aquestes cèl·lules, el GM-CSF bloca la transcripció del *c-fms* i, en no expressar-se el receptor, l'M-CSF és inactiu.

Els macròfags o fagòcits mononuclears, com també se'ls coneix, tenen múltiples funcions que regulen un gran nombre de processos. En la melsa o el fetge, els macròfags eliminen les cèl·lules circulants velles o lesionades, incloent-hi les hematies (Celada, 1981). El ferro contingut en la molècula d'hemoglobina passa a formar part de la ferritina dels macròfags, i aquests alliberen el ferro segons les necessitats eritropoètiques; aquest és el sistema de regulació del metabolisme del ferro de reserva en l'organisme (Celada *et al.*, 1984a). En el teixit ossi, els osteoclasts remodelen l'os segons l'activitat física (pressions) a què se sotmet l'os. Els macròfags també intervenen en el control del metabolisme dels lípids, l'hemostàsia, la reconstrucció tissular, etc.

Referint-nos a la immunologia, els macròfags realitzen tres tipus de funcions: *a*) Directament; destrueixen bacteris (Roth *et al.*, 1979), paràsits (Celada *et al.*, 1982, 1983, 1984b) i virus (i constitueixen, juntament amb l'activitat dels neutròfils, el mecanisme antibacterià més important). A més, poden destruir cèl·lules tumorals (Celada *et al.*, 1980). *b*) Indirectament; poden actuar sobre altres cèl·lules mitjançant la secreció de més de cent molècules diferents, amb pesos moleculars que varien entre 32 i 440 kD i activitats biològiques que van des de la inducció de la proliferació fins a la mort cel·lular. *c*) Com a cèl·lules accessorïes de la resposta immunitària, per la seva capacitat d'ingerir i digerir antígens i presentar els pèptids immunogènics als limfòcits T, i amb això engeguen la resposta inhibidora específica (vegeu la fig. 3). Per això és necessari que els pèptids s'associïn amb les molècules del complex major

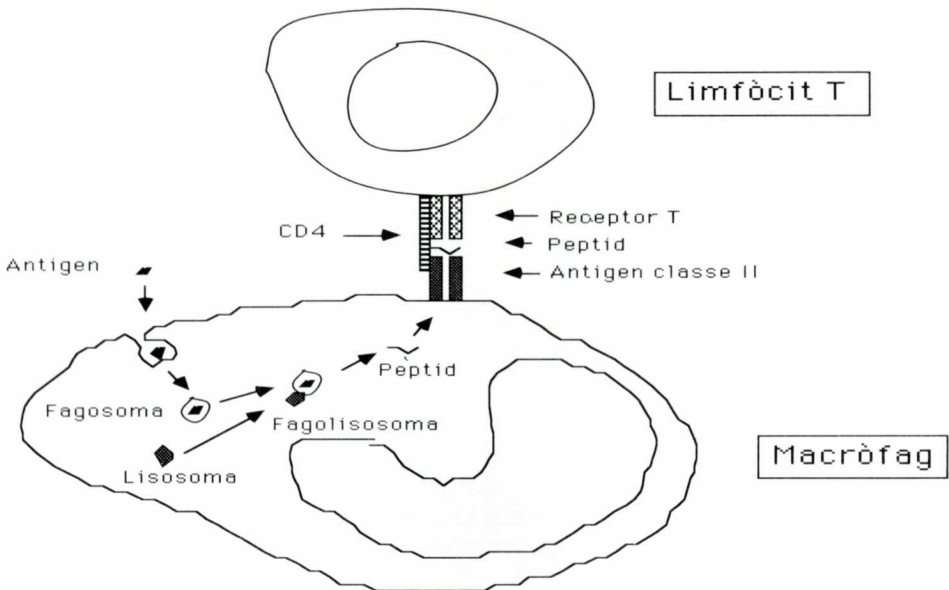


FIGURA 3. Presentació d'antigen als limfòcits T.

d'histocompatibilitat (MHC) de classe I (estableixen contacte amb limfòcits T, CD8⁺ o citotòxics) o classe II (estableixen contacte amb limfòcits T, CD4⁺ o *helper*, o ajudadors. En expressar-se el complex format per l'MHC i el pèptid, el receptor de les cèl·lules T interactua físicament amb aquest complex i es produeix l'activació dels limfòcits T i la posterior segregació de citoquines (limfòcits *helper*) o inducció de citotoxicitat (limfòcits citotòxics).

Mecanisme d'activació del macròfag

Els limfòcits T estimulats següen una sèrie de factors que indueixen un gran nombre de modificacions funcionals i bioquímiques en els macròfags. Aquest procés ha estat anomenat *activació dels macròfags*, i la limfocina que indueix aquests canvis ha estat anomenada *factor activador dels macròfags* o MAF *macrophage activating factor*. En els últims anys, les dades obtingudes en diversos laboratoris, incloent-hi el nostre, han identificat el factor activador dels macròfags com l'interferó gamma (IFN γ) (Schreiber i Celada, 1985; Schreiber *et al.*, 1986).

a) Interacció de l'IFN γ amb la superfície cel·lular: descripció del receptor

En la superfície de les cèl·lules existeixen uns elements que reconeixen específicament certes molècules, que són conegudes amb el nom de *receptors*. La funció d'aquests receptors és doble: transporten molècules des de l'exterior de la cèl·lula i, en alguns casos, després de la interacció amb el lligand, indueixen una sèrie de senyals intracitoplasmàtics que fan que la cèl·lula s'activi. En un primer estudi, vam intentar identificar un receptor específic per a l'IFN γ en la superfície dels macròfags (revisat a Celada, 1988a). En els nostres primers experiments vam

utilitzar l'IFN γ natural no purificat procedent d'un hibridoma T produït en el nostre laboratori. Els macròfags de la cavitat peritoneal o de la medul·la òssia de ratolí eren capaços d'absorbir l'activitat de l'IFN γ (Celada *et al.*, 1984c), i també els fibroblastes, mastòcits i limfòcits T de ratolí. Tanmateix, els macròfags de rata, hámster, cobai o les cèl·lules humanes (monòcits, granulòcits, limfòcits i eritròcits) aïllats de la sang perifèrica (Aguado *et al.*, 1980) no eren capaços d'absorbir l'IFN γ de ratolí. Els macròfags de la cavitat peritoneal de ratolí eren capaços de fixar microesferes fluorescents recobertes d'IFN γ recombinat de ratolí. Encara que aquests experiments suggerien la presència d'un receptor que interactua amb l'IFN γ en la superfície cel·lular, la demostració es va portar a terme mitjançant l'ús d'IFN γ recombinant de ratolí i marcat radioactivament amb I¹²⁵. Mitjançant l'anàlisi de Scatchard, 12.000 molècules d'IFN γ es fixaven a la superfície dels macròfags de la medul·la òssia amb una constant d'afinitat (K_a) de $0,9 \times 10^{-8}$ M (Celada *et al.*, 1984c). Aquests resultats indicaven que l'IFN γ reaccionava amb un receptor en la superfície de la cèl·lula d'una forma específica i saturable, i demostraren per primera vegada la presència d'aquest receptor en la superfície dels macròfags.

En els estudis d'absorció hem utilitzat l'activitat citotòxica (capacitat de destruir cèl·lules tumorals) perquè és el test més sensible de què disposem per a mesurar l'activitat dels macròfags dels múrids per l'IFN γ , i s'ha demostrat una gran reproductibilitat (Russell *et al.*, 1986).

En el nostre laboratori vam obtenir anticossos monoclonals contra l'IFN γ recombinat de ratolí mitjançant immunització de hámsters (Schreiber *et al.*, 1985). Mitjançant l'ús de molècules híbrides d'IFN γ humà i murí es va posar en evidència que alguns anticossos estaven dirigits contra la part amino i altres contra la carboxilo terminal de la molècula de l'IFN γ . Els anticossos monoclonals que inhibien l'activitat citotòxica

del macròfag induïda per l'IFN γ inhibia també la unió de l'IFN γ marcat radioactivament en el receptor, mentre que els monoclonals que no afectaven la funció, tampoc no inhibien la fixació de l'IFN γ en la superfície cel·lular. Aquests resultats indiquen que la unió de l'IFN γ al receptor és la primera etapa necessària per a la inducció de l'activitat determinada per l'IFN γ en els macròfags.

En una altra sèrie d'experiments vam estendre les nostres investigacions sobre el receptor de l'IFN γ al sistema humà. Els monòcits humans obtinguts de sang perifèrica i les línies cel·lulars de macròfags (U937) i promielòcits (HL60) fixaven l'IFN γ humà recombinant i marcat radioactivament d'una forma específica, saturable i reversible (Celada *et al.*, 1985). A 4 °C els diferents tipus de cèl·lules fixaven entre 3.000 i 7.000 molècules d'IFN γ amb una afinitat molt similar ($K_a = 4-12 \times 10^{-8}$ M). No es van trobar modificacions en el nombre o la K_a dels receptors quan els monòcits o les cèl·lules U937 es van diferenciar en macròfags adults o en granulòcits polimorfonuclears. Això suggereix que el receptor de l'IFN γ no es modifica amb la maduració o diferenciació cel·lular. La importància funcional del receptor es va posar de manifest, ja que la quantitat necessària de l'IFN γ per a saturar el receptor es correlacionava amb la necessària per a induir el màxim de receptors Fc. Els estudis duts a terme amb agents permeabilitzants de la membrana demostraven que només el 46 % del nombre total de receptors s'expressen en la superfície de la membrana. La natura proteínica del receptor es va posar de manifest mitjançant tractament amb tripsina o pronasa (agents proteolítics), que reduïen la fixació de l'IFN γ marcat radioactivament al 13 % i 5 %, respectivament. El receptor es va caracteritzar parcialment mitjançant gels de poliacrilamida de membranes de macròfag purificades i incubades amb IFN γ marcat radioactivament. El complex receptor-ligand produïa una banda de pes molecular relatiu de 104 ± 18 kD. Després de sostreure el pes del ligand, el

pes molecular del receptor deu ser aproximadament de 70 kD.

b) Interacció de l'IFN γ dins la cèl·lula

La majoria dels estudis previs amb l'IFN γ han estat realitzats a 4 °C i per tant només mostren la fase inicial de la interacció del receptor amb el lligand en la superfície cel·lular. El nostre interès es va centrar a estudiar el que passa amb l'IFN γ quan les cèl·lules es cultiven a 37 °C. A 4 °C, el tractament amb pronasa elueix el 96 % de l'IFN γ marcat radioactivament que es fixa a la superfície dels macròfags. No obstant això, a 37 °C, el 65 % de l'IFN γ es fa resistent a l'efecte de la pronasa, cosa que suggereix que l'IFN γ s'internalitza (Celada i Schreiber, 1987). Els macròfags degraden IFN γ marcat radioactivament a 37 °C, però no a 4 °C, a un ritme constant d'unes 7.000 molècules/(cèl·lula i hora) durant un període mínim de 12 hores. La quantitat d'IFN γ degradada tenia correlació amb la quantitat fixada a la superfície cel·lular. El ritme constant de captació d'IFN γ pels macròfags es deu a l'existència d'un *pool* intracel·lular de receptors (62 % del total) i a un reciclament del receptor després d'alliberar-se del lligand en el compartiment dels lisosomes. Això últim es va demostrar utilitzant amines lisosomotròpiques, que bloquen la degradació i indueixen una acumulació intracel·lular del receptor.

La degradació no s'inhibia en presència de cicloheximida la qual cosa indica que no es requereix una síntesi *de novo* del receptor. Per a la inducció de secreció de H₂O₂, l'ocupació del 100 % dels receptors de l'IFN γ és requisit necessari i suficient. Per a la inducció d'activitat citotòxica es necessita saturar al 300 % el nombre total de receptors. És a dir, que els receptors s'han d'expressar dues vegades per a poder internalitzar un nombre suficient de molècules d'IFN γ capaç d'induir citotoxicitat. Això explica les quatre hores d'interacció requerides pel macròfag per a la inducció de citotoxicitat,

període durant el qual el receptor és expressat tres vegades en la superfície cèl·lular. Aquests resultats demostren que l'IFN γ s'internalitza i el reciclatge del receptor és essencial per a la inducció d'activitat tumoricida.

Arribats a aquest punt, el nostre interès fou l'estudi del que passa immediatament després de la interacció del receptor amb el lligand i la transducció de senyals des de la superfície cel·lular a l'espai intracel·lular. Les fenotiacides i el R24571, coneguts antagonistes de les proteïnes fixadores de calci (proteïna cinasa C i calmodulina), bloquen, d'una manera que depèn de la dosi emprada, la inducció per IFN γ de la citotoxicitat dels macròfags (Celada i Schreiber, 1986). Després de blocar la mobilització de calci intracel·lular amb Quin 2, no es va observar cap resposta a l'IFN γ . Les drogues utilitzades no afectaven la fixació de l'IFN γ a la superfície de la cèl·lula o el processament. Els activadors de la proteïna cinasa C (tals com els esters del forbol, PMA) i els ionòfors de calci afegits juntament eren capaços d'induir activitat citotòxica en els macròfags, però no en experiments individuals amb cadascun dels components. Aquests resultats suggereixen que l'activació de la proteïna cinasa C i la mobilització intracel·lular del calci poden ésser necessaris per a la inducció d'activitat citotòxica pels macròfags com a resposta a l'IFN γ .

Els models animals amb defectes congènits són molt útils per a estudiar els mecanismes d'acció. Aquest és el cas dels ratolins A/J, els macròfags dels quals en comparació als d'altres soques requereixen aproximadament deu vegades més IFN γ per induir la mateixa activitat citotòxica (Celada *et al.*, 1984d). Aquest dèficit no va acompanyat d'una reducció del nombre de receptors en la superfície cel·lular, o d'un mal processament de l'IFN γ per la cèl·lula (Hamilton *et al.*, 1986). En els macròfags dels ratolins A/J no es va demostrar cap activació de la proteïna cinasa C determinada per l'IFN γ , encara que l'addició d'un ionòfor de calci i de PMA indueixen en aquests macròfags l'activitat citotòxica. Aquestes dades indiquen que

l'alteració en els macròfags A/J es deu a un dèficit d'interacció entre el receptor i l'activació de la proteïna cinasa C.

Els macròfags preincubats amb complexos immunitaris tenen suprimida la inducció de citotoxicitat per l'IFN γ (Celada, 1988b). La preincubació amb immunocomplexos no altera ni la fixació de l'IFN γ en la superfície cel·lular ni el processament. La incubació de macròfags amb dosis altes de PMA té un efecte similar al dels complexos immunitaris. Aquestes dades suggereixen que una forta activació de la proteïna cinasa C suprimeix una activació subsegüent dels macròfags per l'IFN γ .

c) *Estudis amb RNA missatger*

Fins ara s'ha considerat el procés d'activació dels macròfags com una entitat global en la qual l'IFN γ indueix, mitjançant un mateix mecanisme, un gran nombre de funcions. L'objectiu del següent estudi era comprovar aquesta hipòtesi utilitzant l'expressió de tres gens diferents que codifiquen funcions simples tals com l'expressió d'IA (el gen I-A β , que codifica la cadena β de la molècula IA), de TNF i de la proteïna C3 del sistema del complement. La quantificació de l'RNA missatger es va dur a terme mitjançant un sistema de protecció de RNasa després d'hibridar en fase líquida l'mRNA amb una sonda de RNA «antisentit» marcada radioactivament.

En un primer estudi vam determinar el temps mínim que requereix la interacció de la cèl·lula amb l'IFN γ per a induir l'expressió de gens, i també l'expressió en la superfície cel·lular de l'antigen IA. Mitjançant estudis en els quals es combinaven diferents dosis d'IFN γ amb diferents períodes d'incubació, es va arribar a la conclusió que l'expressió de gens era directament proporcional a la quantitat d'IFN γ captada pels macròfags (Celada i Maki, 1989a). El contacte directe de l'IFN γ amb els receptors en la superfície cèl·lular no és suficient per a la inducció d'IA, fet que suggereix que l'IFN γ actua en l'àmbit intracel·lular. Segons els nostres

càlculs, per a obtenir un màxim d'expressió d'IA es requereix la internalització d'un nombre de molècules similar al del nombre de receptors. És a dir, la interacció de 10.000 molècules d'IFN γ indueix el màxim d'expressió d'IA en la superfície cel·lular.

Els macròfags de la medulla òssia (població homogènia i no estimulada), després d'incubarlos amb IFN γ , expressen quantitats creixents de mRNA per als gens I-A β , TNF i C3 (Celada *et al.*, 1989) amb cinètiques molt diferents. Mentre que l'mRNA I-A β augmenta lentament i arriba a un «altiplà» a les 48 hores, els nivells de mRNA-TNF augmenten ràpidament i arriben a un «altiplà» al cap de quatre hores. La cinètica de l'expressió de l'mRNA C3 era intermèdia entre els altres dos gens. Mitjançant experiments de transcripció *in vitro run-on* vam demostrar que l'IFN γ actua incrementant la transcripció dels tres gens. A més a més, per als gens I-A β i C3, l'IFN γ actua després de la transcripció, encara que no ho fa així per al TNF.

La cicloheximida, un inhibidor de la síntesi proteínica, té efectes dispersos en l'expressió dels tres gens. Aquesta droga inhibeix completament la inducció d'I-A β -RNA per l'IFN γ . Per a la inducció d'aquest gen és necessària la síntesi proteica només durant els trenta primers minuts d'interacció de l'IFN γ amb els macròfags. En les cèl·lules tractades amb IFN γ i cicloheximida hi ha una superinducció de l'mRNA-TNF i C3. Els estudis de cinètica de l'RNA demostren que l'augment de l'RNA-TNF és degut a una estabilització del TNF-mRNA; és a dir, que la cicloheximida inhibeix la síntesi d'una proteïna de vida mitjana molt breu que degrada el TNF-mRNA. Per al C3, la vida mitjana de l'mRNA no està afectada per la cicloheximida; això suggereix que actua en la transcripció blocant probablement un repressor.

El lipopolisacàrid (LPS) té un efecte diferent sobre la inducció dels tres gens. Per al gen I-A β , l'LPS inhibeix l'efecte de l'IFN γ . Per al TNF, l'LPS té un efecte sinèrgic amb l'IFN γ , i per al C3, l'LPS no afecta la inducció determinada per l'IFN γ . Tots aquests resultats suggereixen que

l'IFN γ actua a través de diferents vies metabòliques per induir l'expressió dels diferents gens i que el procés d'activació no és una entitat simple, sinó més aviat el resultat d'un procés extremament complex.

En els últims anys s'han desenvolupat inhibidors específics de la proteïna cinasa C i de la calmodulina. Aquests inhibidors ens van ésser útils per a determinar el sistema de transducció de senyals a través de la membrana que utilitza l'IFN γ per a induir l'expressió dels gens que codifiquen el TNF i l'I-A β . Els esters del forbol, activadors de la proteïna cinasa C, estimulen l'expressió del gen del TNF però no la de l'I-A β (Celada i Maki, 1991). La inducció del TNF-mRNA és a nivell transcripcional. Els inhibidors específics de la proteïna cinasa C com el H7 i l'esfingosina afecten la inducció de l'mRNA-TNF, però no la d'I-A β determinada per l'IFN γ , encara que, els inhibidors de la calmodulina (W7 i trifluoperazina) inhibeixen l'efecte de l'IFN γ per a ambdós gens. Aquests resultats indiquen que l'expressió del gen del TNF en els macròfags pot modular-se mitjançant dues vies metabòliques, una que depèn de l'activació de la proteïna cinasa C i altra que depèn de la calmodulina. Tanmateix, per a la inducció de l'mRNA I-A β , l'IFN γ actua activant el sistema metabòlic que depèn de la calmodulina (vegeu la fig. 4).

d) Control de l'expressió del gen I-A β mitjançant factors de transcripció

Un dels problemes més actuals en biologia molecular és l'estudi dels mecanismes de la regulació de la transcripció de gens. Fins ara es desconeix el mecanisme íntim, però se sap que les parts del gen que estan més enllà del començament de la transcripció solen ésser elements reguladors, l'eliminació dels quals inhibeix la transcripció del gen. També s'ha vist que hi ha una sèrie de proteïnes (elements *trans*) que es fixen sobre àrees específiques (elements reguladors o *cis*) i en alguns casos, s'ha pogut

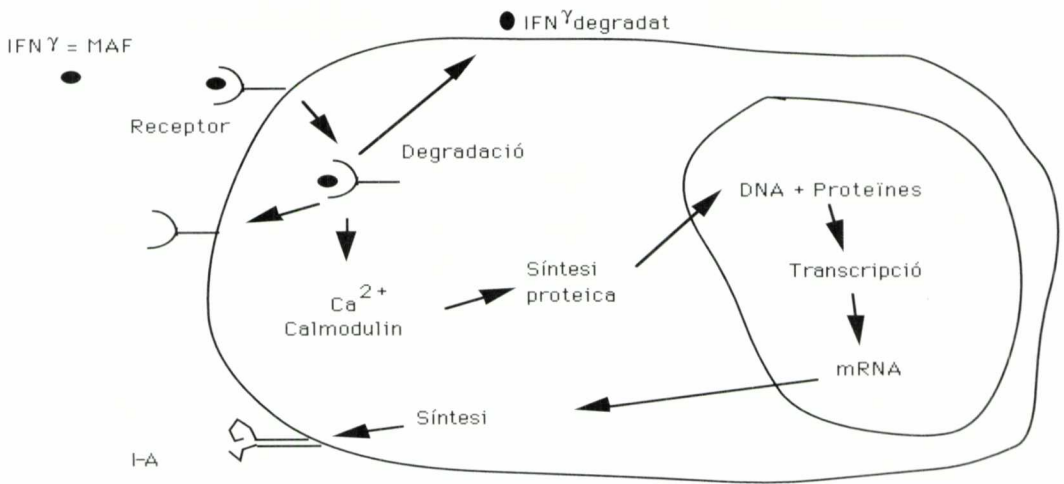


Figura 4. Mecanisme d'activació dels macròfags per interferó gamma (IFN γ)

demonstrar mitjançant estudis *in vitro* que aquestes proteïnes són capaces d'induir la transcripció (Celada, 1991).

Les molècules del complex major d'histocompatibilitat són necessàries per a la presentació dels antígens als limfòcits T ajudadors (CD4). Aquestes molècules que transporten el pèptid derivat de la digestió dels antígens fins a la superfície cel·lular consten de dues cadenes, α i β , codificades per gens diferents. Tots els gens de classe II de l'MHC estudiats fins ara (humans, de ratolins, de rates, bovins, etc) posseeixen tres regions homòlogues que es denominen *caixes W, X, i Y*. Aquestes seqüències de 7, 13 i 8 bases estan separades, respectivament, per 19-20 bases, es troben localitzades a unes 50-150 bases del punt on comença la transcripció i s'han identificat com elements *cis-acting* que regulen la transcripció.

Utilitzant un mètode de retardament en electroforesi d'acrilamida hem posat en evidència la presència d'un factor nuclear (proteïna) que s'uneix específicament a la seqüència Y del gen IAB del ratolí (Celada *et al.*, 1988). Aquest factor es troba present en els limfòcits T i B, macròfags, mastòcits i fibroblast de ratolí i en limfòcits B y macròfags humans, i no es modifica si s'incuben les cèl·lules amb IFN γ . La seqüència a la qual s'uneix la proteïna és ATTGGTT, i s'ha determinat mitjançant tècniques de protecció de DNasa I i dimetil sulfat. La cadena homòloga d'aquesta seqüència (GACTAACC) conté una caixa CCAAT invertida, seqüència que es troba associada en molts promotors i la reconeixen factors de transcripció, CTF i el factor nuclear I (NF-I). Tanmateix, els oligonucleòtids que contenen la part a la qual es fixa l'NF-I i l'alfa globina CCAAT no

competeixen per la fixació del factor que vam descriure en la seqüència conservada Y, i així suggereix que es tracta d'una proteïna diferent.

Recentment hem separat els extractes nuclears de limfòcits B mitjançant cromatografia i, basant-nos en les diferents càrregues, hem obtingut dues fraccions, els components actius de les quals hem anomenat *factor A* (aniònic) i *factor B* (catiònic). Ambdós factors s'uneixen molt dèbilment a la seqüència Y del gen IAB, però junts es potencia aquesta unió més de cent vegades (Celada i Maki, 1989b). Aquest és un exemple de sinergisme entre factors nuclears, similar al d'altres factors com els oncogens *jun* i *fos*. Aquests factors han estat purificats i tenen un pes molecular de 46 i 34 kD.

Utilitzant el gen IE α , un grup diferent al nostre ha clonat dues proteïnes, NF-YA i NF-YB, que s'uneixen a la seqüència Y. Coneixent les seqüències d'NF-YA i NF-YB, hem utilitzat la tècnica de PCR per a clonar aquestes proteïnes i, una vegada expresades, hem comprovat que també s'uneixen a la caixa Y del gen IAB (Celada *et al.*, 1993a). A més, es poden intercanviar NY-A amb el factor A i l'NF-YB amb el factor B, i això suggereix una identitat entre ambdós components. Finalment, les construccions antisentit transfectades en limfòcits B inhibeixen l'expressió d'IAB, i això suggereix que *in vivo* aquests factors són necessaris per a la transcripció d'IAB.

Utilitzant una tècnica diferent en la producció d'extractes nuclears, mitjançant els mètodes de retardament en gels d'acrilamida i protecció de dimetil sulfat, hem posat en evidència la fixació d'una proteïna sobre la seqüència conservada X (Celada i Maki, 1989c). Contràriament als factors A i B que es fixen sobre la seqüència Y, per a cada gen IA o IE, α o β , existeixen diferents proteïnes que es fixen a la seqüència X (que tenen una homologia relativa) amb pesos moleculars diferents (Celada i Maki, 1989c).

El nostre següent objectiu fou clonar la proteïna que s'uneix a la caixa X. En un primer moment, utilitzant grans quantitats d'extractes nuclears, vam aconseguir aïllar la proteïna

mitjançant tècniques de cromatografia. La purificació final es va dur a terme amb una columna d'afinitat que contenia oligonucleòtids amb la seqüència de la caixa X. D'aquesta manera es va obtenir una proteïna de pes molecular 45 kD que es fixava específicament en la seqüència X. Es va intentar fer una seqüenciació d'aminoàcids, però l'N terminal, com passa amb molts factors de transcripció, estava blocat. Es va tractar de digerir la proteïna i produir pèptids, però atès el poc material inicial, la quantitat de pèptids no fou suficient per a permetre una seqüenciació d'aminoàcids.

Davant d'aquests problemes, vam decidir intentar un mètode alternatiu per clonar el factor de transcripció. Es va utilitzar una genoteca d'expressió (λ gt11) i es va comprovar, mitjançant oligonucleòtids marcats radioactivament, que contenien la caixa X. Es van obtenir dos clons de diferent mida, però que codificaven la mateixa proteïna, que vam anomenar IAX (Celada *et al.*, 1993b). Basant-nos en la seqüència, vam designar dos pèptids contra els quals vam produir anticossos policlonals en el conill. Mitjançant experiments de Western, vam demostrar que ambdós anticossos reconeixien en els extractes nuclears totals una proteïna de pes molecular de 45 kD. Un dels anticossos inhibia la unió dels extractes nuclears al DNA contingut en la caixa X (probablement era degut a una unió de l'anticòs contra la part de la proteïna que reconeix la caixa X), mentre que l'altre anticòs produïa una banda proteïna-DNA-anticòs amb un pes molecular superior al del complex DNA-proteïna. Aquestes dades suggereixen que la proteïna clonada era la que s'uneix a la caixa X present en els extractes nuclears totals. Per confirmar aquesta hipòtesi, vam fer una construcció antisentit que, en ésser transfectada en limfòcits B, inhibia l'expressió del gen IAB.

També hem posat de manifest, utilitzant transfeccions com fragments del promotor i el gen reportador CAT, que la seqüència W és important per a l'expressió del gen IAB, l'expressió del qual està induïda per IFN γ . Utilitzant extractes totals, hem mostrat la presència

d'una proteïna que s'uneix a la caixa W (Celada *et al.* 1993c). Curiosament, l'expressió d'aquesta proteïna en macròfags derivats de medul·la òssia, però no en línies cel·lulars de macròfags, n'indueix per IFN γ .

La localització d'aquestes diferents proteïnes en el promotor del gen IAB β és el primer pas per poder aclarir els mecanismes que controlen l'expressió d'aquest gen. És possible que les seqüències repetides i invertides, localitzades

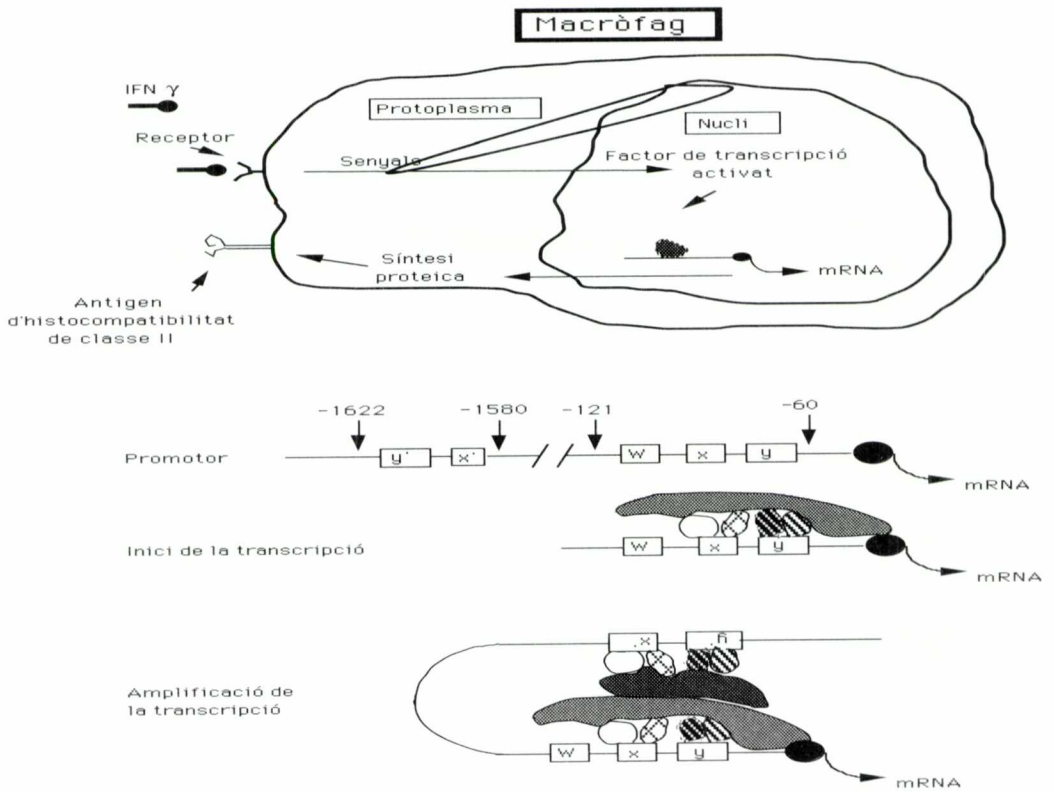


FIGURA 5. Mecanisme molecular de l'expressió d'antigen de classe II del complex major d'histocompatibilitat en macròfags.

en la regió —1.200 bases— serveixi també d'elements sobre els quals es fixin altres proteïnes, i que l'activació del promotor necessiti una sèrie de proteïnes que interaccuïn entre elles. Es podria posar de manifest un model en què el promotor, mitjançant un gran llaç, fes coincidir les seqüències repetides (vegeu la fig. 5). Potser el paper de l'IFN γ sigui induir l'expressió del factor que s'uneix a la seqüència W o induir modificacions d'aquestes proteïnes tals com fosforilacions o glicosilacions.

A més a més, hem intentat buscar una aplicació pràctica a aquests estudis. Els glucocorticoides són supressors potents de les molècules del complex major d'histocompatibilitat. Aquesta propietat és la base terapèutica en els casos de rebuig de trasplantaments. En els nostres experiments, els glucocorticoides inhibeixen l'expressió del gen IAB tant en limfòcits B com en macròfags sota la inducció de l'IFN γ (Celada *et al.*, 1993d). Aquest efecte negatiu és degut a una interacció amb la caixa X del promotor. En estudis *in vitro*, hem pogut demostrar que el receptor dels glucocorticoides (factor de transcripció que s'indueix per la interacció dels glucocorticoides amb la superfície cel·lular) inhibeix la unió del factor de transcripció que s'uneix a la caixa X. Aquests experiments demostren que el mecanisme d'inhibició de l'expressió dels antígens del complex major d'histocompatibilitat està produïda per una interacció proteïna-proteïna entre el receptor dels glucocorticoides i el factor de transcripció que s'uneix a la caixa X. Aquest mecanisme pot ésser útil per dissenyar nous fàrmacs que redueixin l'expressió dels antígens del complex major d'histocompatibilitat en malalties autoimmunitàries, rebuigs, etc.

Mecanisme de proliferació dels macròfags

En un intent de clonar la proteïna que es fixa a la caixa Y del promotor del gen IAB, vam

utilitzar una genoteca d'expressió i, com a sonda, oligonucleòtids radiomarcats amb la seqüència de la caixa Y. Quan es va portar a terme aquest experiment, desconeixiem que la proteïna que s'unia a la caixa Y estava formada per dos components, factor A i factor B, com hem dit prèviament. Mitjançant aquest sistema, vam clonar una proteïna que s'unia a una seqüència contigua a la caixa Y —GAGGAA—, rica en purina, per la qual cosa la vam anomenar PU.1. En ésser específica de macròfags i limfòcits B i contenir altres tipus de proteïnes cel·lulars que es fixaven a la mateixa seqüència, li vam posar el número 1 (Klemsz *et al.*, 1990). Aquesta proteïna, PU.1, cotransfectada en cèl·lules HeLa, juntament amb una construcció que contenia el promotor de la timidina cinasa, un oligonucleòtid amb la caixa PU i el gen reportador cloramfenicol aminotransferasa (CAT), que servia d'indicador, tenia activitat transcripcional. Mitjançant una sèrie de deleccions des de la part amino o carboxil terminal, es va poder determinar el lloc de fixació al DNA. Sorprenentment, la part en la qual s'unia al DNA tenia una homologia del 41 % amb els oncogens de la família *ets*, i fou la primera vegada que es demostrava que aquests oncogens eren factors de transcripció. De fet, es va veure que PU.1 era el producte de l'oncogen Spi-1, que apareixia en les eritroleucèmies (Moreau-Gachelin *et al.*, 1990). A més a més, es va demostrar que tots els oncogens de la família *ets* s'unien a la mateixa regió del DNA, que es va anomenar *domini ets* (Karim *et al.*, 1990).

Malgrat definir l'àrea d'unió al DNA, no sabem els gens sobre els quals actua el factor de transcripció PU.1, encara que existeixen caixes PU en un gran nombre de citoquines i factors de creixement, com GM-CSF i M-CSF, que són produïts pel macròfag. La relació amb els oncogens ens va fer pensar que podia tenir un paper en la proliferació de macròfags. En efecte, els macròfags de medul·la òssia transfectats amb PU.1 proliferaven molt més que els controls transfectats amb vectors control. A més, les construccions antisentit transfectades en macròfags o els oligonucleòtids antisentit en el

medi de cultiu inhibien la proliferació dels macròfags estimulats per M-CSF o GM-CSF, però no per IL3 (Celada *et al.*, 1993e). Els sobrenedants dels macròfags transfectats amb PU.1 augmentaven la proliferació en relació amb els controls, i això suggeria que alliberaven un factor de creixement produït de manera autocrina. Utilitzant anticossos monoclonals contra l'M-CSF o GM-CSF, vam poder concloure que els macròfags transfectats amb PU.1, produïen un excés de GM-CSF, podent ésser aquesta la causa de l'augment de proliferació.

Les cèl·lules obtingudes de la medulla òssia de ratolins i transfectades amb PU.1 quan s'introdueixen en animals irradiats, desenvolupen una síndrome preleucèmica amb cèl·lules circulants hematopoètiques immadures, que tenen una morfologia alterada; entre aquestes trobem megacariòcits, granulòcits, monòcits i limfòcits (Celada *et al.*, manuscrit en preparació).

La proteïna PU.1 immunoprecipitada de macròfags migra amb un pes molecular de 43,5 kD, amb quantitats menors de 44,5 i 38 kD. El tractament amb fosfatasa àcida elimina alguna d'aquestes formes, indicant que es deuen a una

fosforilació (Van Beveren *et al.*, 1993). L'anàlisi del contingut en fosfoaminoàcids de les tres espècies detectades indica que estan fosforilades només en residus de serina. PU.1 sintetitzada en bacteris, pot ésser fosforilada *in vitro* en serines mitjançant la caseïna cinasa II (CK II). Els llocs de predicció d'activació de la CK II en PU.1 han estat mutats. Les proteïnes resultants seguien unint-se al DNA. Tanmateix, les mutacions de les serines 41 i 45 feien que desaparegués la banda de 44,5 kD. Les mutacions 41 i 45 inhibien parcialment l'activació de la transcripció d'un gen reportador. A més, les formes mutades no estimulaven la proliferació de macròfags, sinó que la inhibien. Aquests estudis demostren que la fosforilació del factor de transcripció PU.1 en les serines 41 i 45 regula la seva activitat transcripcional i les formes mutants interfereixen amb l'activitat de la proteïna endògena (vegeu la fig. 6).

Hem clonat el gen *hck*, específic de macròfags i limfòcits B, que és un homòleg de l'*lck*, que codifica una tirosina cinasa específica de limfòcits T. La funció de l'*lck* està relacionada amb l'activació dels limfòcits T produïda pel

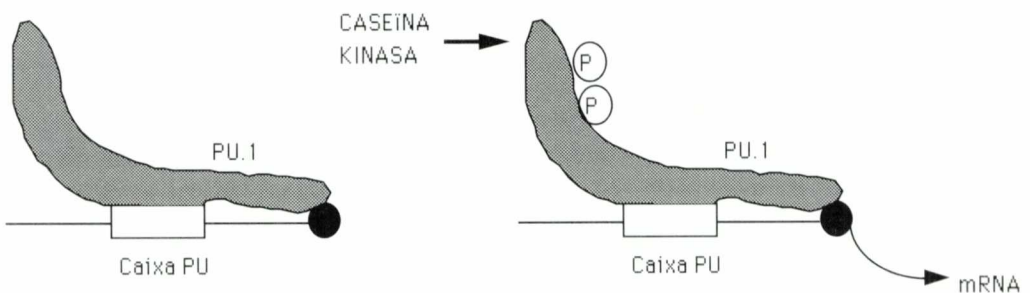


FIGURA 6. Activació de PU.1 mitjançant fosforilació.

receptor de l'antigen i es troba connectada a les molècules CD4 o CD8. En macròfags, la funció del producte de l'*hck* és desconeguda. La transfecció *dehck* antisentit té un efecte inhibidor sobre la proliferació dependent de M-CSF. A més, hem produït anticossos contra la proteïna *hck*, la qual cosa ens ha servit per a demostrar, mitjançant immunoprecipitacions, la inducció d'aquesta proteïna en estimular els macròfags amb M-CSF (Celada *et al.*, manuscrit en

preparació). Actualment hem eliminat el gen *hck* mitjançant tècniques de recombinació homòloga *knock out* en cèl·lules ES pluripotents. Aquestes cèl·lules seran molt útils per a definir la funció del gen *hck* una vegada que les diferenciem *in vitro* o en models animals.

Continuant aquesta línia, hem pogut detectar la fosforilació de tirosines en els primers minuts després de l'addició als macròfags de M-CSF, GM-CSF o IL3. L'IFN γ , inhibidor de la

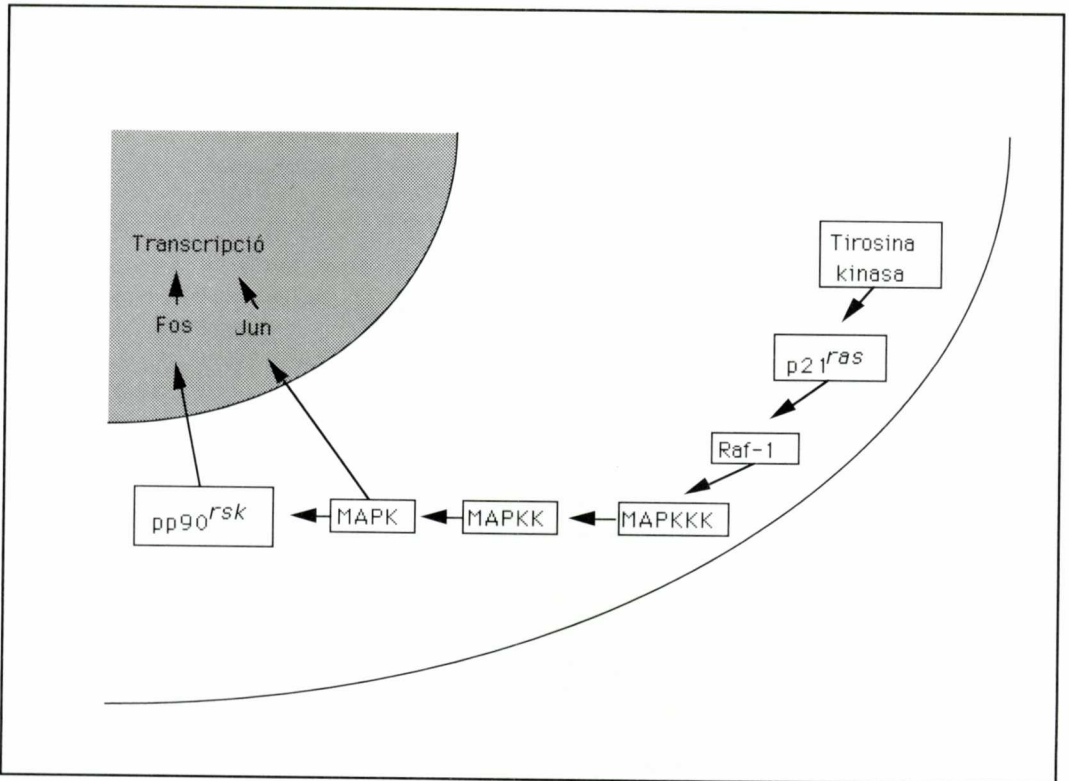


FIGURA 7. Activació de la proliferació de macròfags mitjançant cascades de cinases.

proliferació cel·lular, després de la interacció amb el receptor, bloca la fosforilació de les tirosines en períodes inferiors als cinc minuts (Buss *et al.*, manuscrit en preparació). Això suggereix que la proliferació de macròfags requereix la fosforilació de tirosines i que potser el mecanisme d'inhibició de l'IFNg sigui degut a la falta de fosforilació.

En aquesta línia d'investigació hem de mencionar el paper de les cinases i fosfatases en relació amb la proliferació cel·lular. Se sap que les tirosina cinases en superfície (com el receptor de l'M-CSF o *c-fms*) poden activar tota una sèrie de cinases en cadena, començant pel p21^{ras}, que activa Raf-1, i les cinases MAP *mitogen activated protein*. Aquestes, a la vegada, activen la MAPKKK, que activa MAPKK; aquesta, MAPK, i aquesta, la cinasa pp90^{src} (cinasa ribosòmica S6). La pp90^{src}, finalment, activarà els productes dels oncogens *c-fos* i *c-jun* que induiran la transcripció (vegeu la fig. 7). És molt possible que en aquesta cadena de fosforilacions, des de la membrana cel·lular fins a la inducció de l'expressió de gens, la tirosina cinasa *hck* tingui algun paper important en els macròfags.

BIBLIOGRAFIA

- AGUADO, M. T., N. PUJOL, E. RUBIOL, M. TURA i A. CELADA. (1980). Separation of granulocytes from peripheral blood in a single step using discontinuous density gradients of Ficoll-Urografin. **J. Immunol. Methods** **32**: 41-50.
- CELADA, A. (1981). In vitro phagocytosis and catabolism of opsonized erythrocytes by human monocytes. **Allergol. Immunopath.** **9**: 539-544.
- CELADA, A. (1988a). The interferon gamma receptor. **Lymphokine Research** **7**: 61-73.
- CELADA, A. (1988b). Immune complex inhibition of macrophage activation is not due to an interaction with the binding or processing of interferon gamma. **Immunology** **64**: 187-192.
- CELADA, A. (1991). Factores de transcripción y control de la expresión de los genes. **Investigación y Ciencia** **179**: 42-51.
- CELADA, A. (1993). Enciclopedia hematológica iberoamericana. Monocitopoyesis: regulación, aspectos morfológicos, bioquímicos y funcionales (Ed. A. López Borrasca) Salvat Barcelona (En premsa).
- CELADA, A., M. T. AGUADO, P. H. LAMBERT i A. CRUCHAUD. (1980). Effect of autologous serum and circulating immune complexes on monocyte functions of patients with solid tumors. **Clin. Exp. Immunol.** **41**: 326-335.
- CELADA, A., A. CRUCHAUD i L. H. PERRIN. (1982). Opsonic activity of human immune serum on in vitro phagocytosis of Plasmodium falciparum infected red blood cells by monocytes. **Clin. Exp. Immunol.** **47**: 635-644.
- CELADA, A., A. CRUCHAUD i L. H. PERRIN. (1983). Assessment of in vitro immune phagocytosis of Plasmodium falciparum infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol. Methods** **63**: 263-271.
- CELADA, A., S. STRAY, M. SIAVARAJAN i C. A. FINCH. (1984a). Iron supply for erythropoiesis in the rabbit. **J. Clin. Invest.** **74**: 161-164.
- CELADA, A., A. CRUCHAUD i L. H. PERRIN. (1984b). Independence of role of complement on in vitro immune phagocytosis of Plasmodium falciparum parasitised erythrocytes by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **Inter. Arch. Allergy Applied Immunol.** **73**: 363-366.
- CELADA, A., P. W. GREY, E. RINDERKNECHT i R. D. SCHREIBER. (1984c). Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. **J. Exp. Med.** **160**: 55-74.
- CELADA, A., C. F. NATHAN, N. A. BUCHMEIER i R. D. SCHREIBER. (1984d). Defective IFNg-dependent tumoricidal activity by macrophages (M0) from NCS mice. **J. Leuk. Biol.** **36**: 427-428.
- CELADA, A., R. ALLEN, I. ESPARZA, P. W. GRAY i R. D. SCHREIBER. (1985). Demonstration and partial characterization of the interferon gamma receptor on human mononuclear phagocytes. **J. Clin. Invest.** **76**: 2196-2205.
- CELADA, A. i R. D. SCHREIBER. (1986). Role of protein kinase C and intracellular calcium mobilization in the induction of macrophage tumoricidal activity by interferon-g. **J. Immunol.** **137**: 2373-2379.
- CELADA, A. i R. D. SCHREIBER. (1987). Internalization and degradation of receptor bound interferon g by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. **J. Immunol.** **139**: 147-153.
- CELADA, A., M. SHIGA, M. IMAGAWA, J. KOP i R. A. MAKI. (1988). Identification of a nuclear factor that binds to a conserved sequence of the IAb gene. **J. Immunol.** **140**: 3995-4002.
- CELADA, A. i R. A. MAKI. (1989a). The expression of I-A correlates with the uptake of interferon gamma by macrophages. **Eur. J. Immunol.** **19**: 205-208.
- CELADA, A. i R. A. MAKI. (1989b). DNA binding of the mouse class II major histocompatibility CCAAT factor depends on two components. **Mol. Cell. Biol.** **9**: 3097-3100.

- CELADA, A. i R. A. MAKI. (1989c). Evidence for multiple MHC class II X box binding proteins. **Mol. Cell. Biol.** 9: 5219-5222.
- CELADA, A., M. J. KLEMSZ i R. A. MAKI. (1989). Interferon gamma activates multiple pathways to regulate the expression of the genes for class II major histocompatibility I-Ab, tumor necrosis factor and complement component C3 in mouse macrophages. **Eur. J. Immunol.** 19: 1103-1109.
- CELADA, A. i R. A. MAKI. (1991). Interferon-g induces the expression of the genes for major histocompatibility class II I-Ab and tumor necrosis factor through a protein kinase C independent pathway. **J. Immunol.** 146: 114-120.
- CELADA, A. i R. A. MAKI. (1992). Transforming growth factor-b enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. **J. Immunol.** 148: 1102-1105, 1992.
- CELADA, A., S. R. MCKERCHER i R. A. MAKI. (1993a). The transcription factor NF-Y is an important transcriptional activator for the expression of the MHC class II gene I-Ab. **J. Immunol.** (En premsa).
- CELADA, A., S. R. MCKERCHER i R. A. MAKI. (1993b). Cloning of the gene for IAX: a tissue-specific transcription factor that binds to the MHC class II IAB X box. (Enviat per a publicació.)
- CELADA, A., S. R. MCKERCHER i R. A. MAKI. (1993c). Identification of a transcription factor that binds to the W box of the IAb gene of the MHC. **J. Immunol.** (En premsa).
- CELADA, A., S. R. MCKERCHER i R. A. MAKI. (1993d). Repression of MHC IA expression by glucocorticoids: the glucocorticoid receptor inhibits the DNA binding of the X box DNA binding protein. **J. Exp. Med.** 177: 691-698.
- CELADA, A., C. VAN BEVERAN, M. J. KLEMSZ i R. A. MAKI. (1993e). The tissue-specific transcription factor PU.1 that is related to the ets oncogene family is involved in macrophage proliferation. (Enviat per a publicació.)
- HAMILTON, T. A., S. D. SOMERS, D. L. BECTON, A. CELADA, R. D. SCHREIBER i D. O. ADAMS. (1986). Analysis of deficiencies in IFN-g-mediated priming for tumor cytotoxicity in peritoneal macrophages from A/J mice. **J. Immunol.** 137: 3367-3371.
- KARIM, F. D., L. D. URNESS, C. S. THUMMEL, M. J. KLEMSZ, S. R. MCKERCHER, A. CELADA, C. VAN BEVERAN, R. A. MAKI, C. V. GUNTHER, J. A. NYE i B. J. GRAVES. (1990). The ets-domain: a new DNA binding motif that recognizes a purine rich core DNA sequence. **Genes Develop.** 4: 1451-1453.
- KLEMSZ, M. J., S. R. MCKERCHER, A. CELADA, C. VAN BEVERAN i R. A. MAKI. (1990). The macrophage and B cell specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. **Cell** 61: 113-124.
- MOREAU-GACHELIN, F., D. RAY, P. TMBOURIN, A. TAVITIAN, M. J. KLEMSZ, S. R. MCKERCHER, A. CELADA, C. VAN BEVERAN i R. A. MAKI. (1990). The PU.1 transcription factor is the product of the putative oncogene Spi-1. **Cell** 61: 1165-1166.
- ROTH, P., A. CELADA i A. CRUCHAUD. (1979). Evaluation of human monocyte function in vitro. **Ann. Immunol.** 130C: 611-620.
- RUSSELL, S. W., J. L. PACE, L. VARESEO, E. AKPORIAYE, E. BLASI, A. CELADA, R. D. SSSCHREIBER, R. M. SCHULTZ, A. P. STEVENSON, C. C. STEWART i J. STEWART. (1986). Comparison of five short term assays that measure nonspecific cytotoxicity mediated to tumor cells by activated macrophages. **J. Leuk. Biol.** 40: 801-813.
- SCHREIDER, R. D. i A. CELADA. (1985). The role of interferon gamma in macrophage activation. **Lymphokines** 11: 87-118.
- SCHREIDER, R. D., L. J. HICKS, A. CELADA, N. A. BUCHMEIER i P. W. GRAY. (1985). Monoclonal antibodies to murine gamma interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. **J. Immunol.** 134: 1609-1618.
- SSCHREIDER, R. D., A. CELADA i N. S. BUCHMEIER. (1986). The role of interferon gamma in the induction of activated macrophages. **Ann. Immunol.** 137C: 203-206.
- VAN BEVERAN, C., M. J. KLEMSZ, A. CELADA, S. R. MCKERCHER i R. A. MAKI. (1993). Phosphorylation of the PU.1 transcription factor: effect on macrophage proliferation. (En premsa)